

Evaluación de la técnica BD MGIT™ TBc® para identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Evaluation of the BD MGIT™ technique for identifying the *Mycobacterium tuberculosis* complex

Ingrid T. Gómez, Claudia R. Llerena y Angie P. Zabaleta

Instituto Nacional de Salud Grupo Micobacterias. Bogotá, Colombia. tgomez@ins.gov.co; cllerena@ins.gov.co; azabaleta@ins.gov.co

Recibido 20 Noviembre 2013//Enviado para Modificación 22 Enero 2014/Aprobado 12 Marzo 2014

RESUMEN

Objetivo Evaluar la técnica BD MGIT™ TBc® para identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de aislamientos en medio de cultivo sólido y líquido.

Materiales y Métodos Se desarrolló un estudio descriptivo, donde se analizaron 117 aislamientos por la técnica de inmucromatografía a partir de cultivos en medio sólido y líquido para identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se calculó coeficiente kappa para determinar el grado de acuerdo entre los dos métodos. Cuando hubo diferencia de resultados estos se confirmaron mediante pruebas convencionales. La herramienta empleada para el análisis de datos fue Epidat 3.1.

Resultados La metodología BD MGIT™ TBc® realizada a partir de cultivos en medio sólido y líquido, presentó un grado de acuerdo excelente con un coeficiente kappa de 0,84.

Conclusión La técnica BD MGIT™ TBc® realizada a partir de cultivos en medio sólido, para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, presenta excelente concordancia, comparada con los resultados obtenidos en medio de cultivo líquido. El Laboratorio Nacional de Referencia recomienda el uso de esta técnica para la identificación de especie en medio de cultivos sólidos.

Palabras Clave: *Mycobacterium tuberculosis*, antígeno, diagnóstico (fuente: DeCS, BIREME).

ABSTRACT

Objective To evaluate BD MGIT™ TBc® technique for identifying the *Mycobacterium tuberculosis* complex using isolates obtained in liquid and solid media.

Methods A descriptive study was conducted in which 117 isolates were analyzed by the immune-chromatography technique obtained from solid and liquid cultures

to identify the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The kappa coefficient was calculated to determine the degree of agreement between the two methods. When there were different results, they were confirmed with a conventional test. The tool used to analyze the data was Epidat 3.1

Results The BD MGIT™ TBc® methodology performed in solid and liquid culture isolates, showed an excellent degree of agreement with a kappa coefficient 0.84.

Conclusion The BD MGIT™ TBc® technique using solid media culture isolates for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has a good correlation compared to results obtained from liquid media culture isolates. The Reference National Laboratory recommends the use of this technique for the identification of species in solid media culture isolates.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, antigen (source: MeSH, NLM).

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial, por esa razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1991 ha desarrollado estrategias enfocadas en el control y tratamiento de la enfermedad, inicialmente con la estrategia DOTS/TAES (Directly Observed Therapy) a partir de la cual se generaron diversas políticas orientadas en lograr las metas mundiales en la lucha antituberculosa, posteriormente, con el fin de cumplir la meta 6 de los Objetivos de Desarrollo del Milenio impuestos en la declaración del milenio de las Naciones Unidas, en que se esperaba ampliar el acceso diagnóstico y a los medicamentos en toda la población afectada, se lanza en el 2006 la estrategia “Alto a la Tuberculosis” a partir de la cual se ha trabajado en la documentación de nuevos y mejores métodos diagnósticos, en el 2007 se generó una política con la que se buscó promover el uso del cultivo en medio líquido mejorando la oportunidad del diagnóstico en aquellos casos en que la baciloscopia es negativa, sin embargo al contar con una prueba rápida fue necesario desarrollar una técnica para la identificación de especie que favoreciera el tiempo entre la detección y el diagnóstico, debido a que este tipo de medio favorece el desarrollo de otras especies de Micobacterias no pertenecientes al complejo (1-5).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* libera al medio de cultivo durante su fase exponencial diferentes proteínas, a la fecha se han identificado 33; El antígeno MPT64, es una de estas, su peso es de 24 kDa, es específica del complejo, dentro de sus características se describe como altamente inmunogénica que estimula la reacción de hipersensibilidad retardada y la proliferación celular en el paciente favoreciendo la diseminación de la micobacteria (4-6).

La prueba rápida BD MGIT™ TBc® se encuentra estandarizada por la casa comercial a partir de medio líquido Midebrook 7H9, esta metodología se fundamenta en la identificación mediante una inmunocromatografía utilizando dos anticuerpos monoclonales de ratón anti MPT64, en el primero se encuentra un conjugado con partículas de oro coloidal, y el segundo está inmovilizado sobre una membrana de nitrocelulosa como material de captura (prueba en línea), la detección se hace mediante un ensayo tipo sándwich (4,5,6).

La red de laboratorios de tuberculosis en Colombia cuenta con instituciones que realizan pruebas de identificación de especie, mediante las técnicas de reducción de nitratos, inhibición de la actividad catalasa a 68°C, detección de niacina y coloración de Ziehl Neelsen. Estos laboratorios requieren capacidad técnica, infraestructura, insumos, reactivos, cumplimiento de normas y requisitos de bioseguridad para el manejo de cultivos, y profesionales capacitados. El proceso es dispendioso requiere una fase pre analítica que incluye preparación de soluciones, reactivos y un adecuado mantenimiento de equipos para asegurar las temperaturas de incubación en el procesamiento de identificación y una analítica que incluye las características del cultivo como pureza, número de colonias y tiempo de desarrollo además de experticia en los profesionales que realizan la metodología. Actualmente los laboratorios que realizan de esta forma la identificación requieren de un cronograma de trabajo debido a la laboriosidad de la técnica.

Las técnicas de cultivo que se realizan en Colombia por lo general se hacen en medio sólido y para el desarrollo bacilar se requieren de tres a cuatro semanas de incubación, tener un resultado de identificación de especie puede tardar aproximadamente una semana posterior al crecimiento del cultivo haciendo que el resultado final de la identificación sea tardío (7).

El objeto de este trabajo fue comparar la utilidad de la metodología inmunocromatográfica BD MGIT™ TBc® a partir de cultivos en medio sólido y líquido, con el fin de proponer la utilización de esta prueba en los laboratorios de la red que hacen este proceso mediante técnicas convencionales.

METODOLOGÍA

Este es un estudio descriptivo, en el cual se compararon los resultados obtenidos de la inmunocromatografía a partir de medio de cultivo sólido

(Ogawa) y líquido (midlebrook 7H9). Se calculó coeficiente de Kappa con un nivel de confianza del 95 % para identificar el grado de acuerdo de las dos metodologías, y el porcentaje de concordancia según la positividad del cultivo. El análisis de datos se hizo con la herramienta Epidat 3.1 (8).

El Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud recibe medios de cultivo sólido para identificación de especie, provenientes de los Laboratorios de Salud Pública del país. Se evaluaron en total 117 cultivos, de los cuales 109 corresponden al complejo *M. tuberculosis* y 8 a Micobacterias no tuberculosas, a los cuales se les realizó extracción de su masa bacilar empleando una asa desechable estéril, las colonias se colocaron en el interior de un tubo falcon de 50 ml que contenía perlas de vidrio estériles de tamaños de 5 a 7 mm, se realizó la homogenización de las colonias por medio de un agitador mecánico durante dos minutos, se agregaron cinco mililitros de agua destilada estéril, seguido de una agitación por treinta segundos para obtener una solución bacilar.

La metodología fue desarrollada en dos fases; en la primera se tomaron 100µl con pipeta automática de la solución bacilar y se colocaron en el dispositivo comercial siguiendo las instrucciones del inserto. En la segunda fase se inocularon 500 µl de la solución bacilar al medio líquido siguiendo el protocolo definido por la casa comercial, cuando fueron positivos para crecimiento, se realizó la prueba inmunocromatográfica, como se describió anteriormente.

La interpretación de resultados se hizo de acuerdo a las instrucciones descritas en el inserto, al visualizar dos bandas en el dispositivo el cultivo fue positivo para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Las pruebas se consideraron negativas cuando no se visualizó la línea en la región de prueba; en estos casos y en los casos no concordantes se realizaron pruebas de identificación convencional (reducción de nitratos, inhibición de actividad de catalasas a 68°C y detección de niacina) (4,5,9-12).

Los controles empleados para el estudio fueron cepas de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC27294 como control positivo, *Mycobacterium fortuitum* ATCC6841 como control negativo y agua destilada estéril como control de reactivo.

RESULTADOS

El grado de acuerdo en la comparación de las técnicas según Landis y Koch fue excelente con un coeficiente kappa de 0,84. De los 117 aislamientos analizados, tres (2,6 %) tenían positividad de una colonia, en éstos los resultados obtenidos fueron concordantes en un 100 %; nueve (7,7 %) presentaban una positividad entre dos a 19 colonias, de éstos ocho (88 %) fueron concordantes en la identificación, 20(17 %) aislamientos tenían una positividad de 20 a 100 colonias, de éstos 18 (90 %) presentaron resultados concordantes, y 2 (10 %) no concordantes, 85(72,6 %) aislamientos con una positividad de más de 100 colonias separadas y/o confluentes presentaron una concordancia del 100 %. En los tres aislamientos que fueron no concordantes, se observó contaminación en el medio de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Concordancia de la prueba inmunocromatográfica a partir de medio de cultivo líquido y sólido según la positividad de los cultivos

Positividad del cultivo	Aislamientos procesados (n=117)	Resultados en medio sólido (positivo/negativo)	Resultados en medio líquido (positivo/negativo)	Aislamientos contaminados	Concordancia %
1 colonia	3	3/0	3/0	0	100
2 a 19 colonias	9	8/1	9/0	1	88
20 a 100 colonias	20	18/2	20/0	2	90
100 colonias separadas o colonias confluentes	85	76/9	76/9	0	100

De los 117 aislamientos evaluados, nueve dieron un resultado negativo para la prueba inmunocromatográfica por las dos metodologías, ocho correspondieron a Micobacterias no tuberculosas y uno se identificó con pruebas convencionales (bioquímicas y enzimáticas) como *M. tuberculosis*.

DISCUSIÓN

En un estudio realizado en el 2010 por Garcia y colaboradores, se evaluó el rendimiento del método inmunocromatográfico empleando aislamientos en medio de Lowenstein Jensen y medio middlebrook 7H9. Del cultivo sólido realizaron una suspensión bacilar de una a tres colonias, usando como diluyente un mililitro de tampón de fosfato y medio middlebrook 7H9, cada uno como un experimento independiente. En 2011, el mismo grupo de investigación analizó 25 aislamientos obtenidos en medio sólido, identificados previamente por técnicas de hibridación, la suspensión bacilar utilizada se preparo con tres a cuatro colonias homogenizadas en

solución salina. Los resultados de los dos estudios fueron concordantes en un 100 %, al compararlos con los obtenidos a partir de cultivo en medio líquido, similar a lo encontrado en éste análisis; es de resaltar que García y colaboradores utilizaron cultivos puros mientras que en éste trabajo se emplearon cultivos sólidos con presencia de contaminación, lo que puede indicar que la concordancia de la técnica se puede ver afectada por las condiciones de pureza del cultivo (1,2,10-12).

En este trabajo se identificó un aislamiento que fue negativo por la prueba inmunocromatografica y confirmado como *M. tuberculosis* por método convencional, Hirano y colaboradores describen que la presencia de resultados falsos negativos en esta metodología puede ser debido a que el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* presenta una alteración en la expresión de la proteína MPT64, puede ser debido a mutaciones, de lesiones o inserciones de citosina guanina en la región codificante del gen de MPT64, haciendo que no sea secretada en el medio y no sea reconocida (6,13-16).

Esta metodología es más sencilla y versátil si se compara con los métodos convencionales que son dispendiosos, riesgosos y requieren cultivos en óptimas condiciones de actividad metabólica, con estos resultados se recomienda su uso partiendo de cultivos en medios sólidos en laboratorios que cumplan con requisitos de bioseguridad (16,17) ♦

Agradecimientos: Se agradece en este trabajo la colaboración a los laboratorios departamentales de Salud Pública y al equipo técnico asistencial y de más profesionales del grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud. ¿Qué es la estrategia DOTS/TAES? Guía para comprender la estrategia de lucha antituberculosa recomendada por la OMS y conocida como estrategia DOTS/TAES. WHO/CDS/CPC/TB/ 99.270; 1999.
2. Organización Mundial de la Salud .Estrategia alto a la TB 2006-2015.WHO/HTM/STB/2006.35.
3. World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income countries: summary report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2007.
4. Barouni AS, Alnajh ZB, Aboguttaia NB, Alamri WM. Evaluation of the BD MGITM TBc identification test for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis Complex from positive BACTEC MGIT 960 cultures in a routine laboratory work. African Journal of

- Microbiology Research. 2012; 6: 1065.
5. García-Martos P, García-Agudo L, Rodríguez-Jiménez MJ, Rodríguez-Iglesias M. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from broth cultures by immunochromatographic assay. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23: 206 .
 6. Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 390.
 7. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis Parte 2 cultivo. Organización Panamericana de salud. 2008.
 8. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-174.
 9. V. G. Kumar, T. A. Urs, R. R. Ranganath, MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of M.tuberculosis isolates. *BMC Research Notes.* 2011; 4: 79
 10. N. A. Ismail, K. Baba, D. Pombo, A. A. Hoosen, Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13: 1045.
 11. H. M. Said, N. Ismail, A. Osman, C. Velsman, A. A. Hoosen, Evaluation of TBc identification immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in samples from broth cultures. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49: 1939.
 12. A. Považan, A. Vukelić, T. Savković, T. Kurucin, Use of immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012;12: 33.
 13. A. J. Bren, Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in liquid culture. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49: 4343.
 14. M.-C. Yu, Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex strain detection. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49: 802.
 15. A. Martin, Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *Journal of microbiological methods.* 2011; 84: 255.
 16. M. Marzouk, Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2011; 69: 396.
 17. J. R. Delany, Guidelines for biosafety laboratory competency: CDC and the Association of Public Health Laboratories. *MMWR Surveill Summ.* 2011; 60 Suppl 2, 1.